

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. August 2004 (12.08.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/068130 A2(51) Internationale Patentklassifikation: G01N 27/447,
H01J 49/04

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MISCHAK, Harald
[DE/DE]; Storchstrasse 6, 31319 Sehnde (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/000119

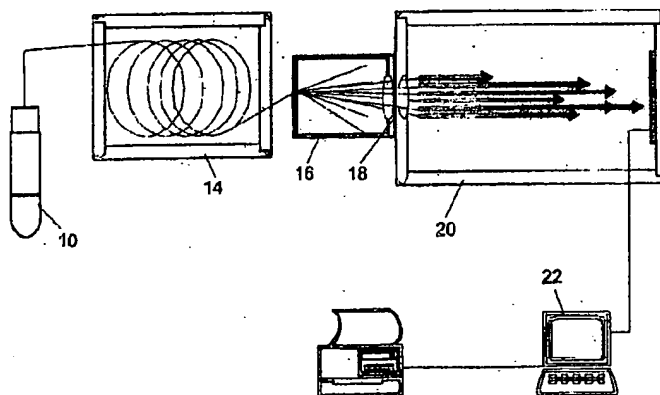
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Januar 2004 (27.01.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 04 106.0 31. Januar 2003 (31.01.2003) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): MOSAIQUES DIAGNOSTICS AND THERA-
PEUTICS AG [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 5, 30625
Hannover (DE).(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THE QUALITATIVE AND/OR QUANTITATIVE DETERMINATION OF A PROTEIN
AND/OR PEPTIDE PATTERN OF A FLUID SAMPLE, WHICH HAS BEEN TAKEN FROM THE HUMAN OR ANIMAL BODY(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR QUALITATIVEN UND/ODER QUANTITATIVEN
BESTIMMUNG EINES PROTEIN- UND/ODER PEPTIDMUSTERS EINER FLÜSSIGKEITSPROBE BESCHRIEBEN, DIE
DEM MENSCHLICHEN ODER TIERISCHEN KÖRPER ENTNOMMEN WIRD

(57) Abstract: The invention relates to a method and a device for the qualitative and/or quantitative determination of a protein and/or peptide pattern of a fluid sample, which is taken from the human or animal body in order to check the condition of the latter. The peptides and proteins of the fluid sample are prepared and then subjected to an analysis, in which reference and sample values that describe conditions of the human or animal body, in addition to deviations and correlations that have been derived from said values are determined and automatically stored in a database. When a new protein and/or peptide pattern is determined, the database is then searched for the best possible correlations. Mass components or structural components of the proteins and/or peptides are determined and stored temporarily. Real masses or structures are then calculated by a common evaluation of the temporarily stored mass components or structural components and an assignment is made to the proteins and/or peptides in the fluid sample.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LJ, MC, NI, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren und eine Vorrichtung zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung eines Protein- und/oder Peptidmusters einer Flüssigkeitsprobe beschrieben, die dem menschlichen oder tierischen Körper zur Kontrolle seines Zustandes entnommen wird. Die Peptide und Proteine der Flüssigkeitsprobe werden nach Aufbereitung einer Analyse unterzogen, wobei Zustände eines menschlichen oder tierischen Körpers beschreibende Referenz und Probenwerte sowie hieraus abgeleitete Abweichungen und Übereinstimmungen ermittelt werden, in einer Datenbank automatisch gespeichert werden und bei einer neuen Protein und/oder Peptidmusterbestimmung automatisch nach bestmöglichen Übereinstimmungen gesucht wird. Dabei werden Massenbestandteile oder Strukturbestandteile der Proteine und/oder Peptide ermittelt und zwischengespeichert. Anschließend werden durch gemeinsame Auswertung der zwischengespeicherten Massenbestandteile oder Strukturbestandteile echte Massen oder echte Strukturen berechnet und aus der Kombination der berechneten echten Massen oder echten Strukturen wird eine Zuordnung zu den in der Flüssigkeitsprobe enthaltenen Proteinen und/oder Peptiden vorgenommen.

Verfahren und Vorrichtung zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung eines Protein- und/oder Peptidmusters einer Flüssigkeitsprobe, die dem menschlichen oder tierischen Körper entnommen wird

Die Erfindung betrifft ein Verfahren nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1 und eine Vorrichtung nach dem Oberbegriff des Anspruchs 6.

Aus der WO 01/84140 A2 ist ein gattungsgemäßes Verfahren und eine gattungsgemäße Vorrichtung zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung eines Protein- und/oder Peptidmusters einer Flüssigkeitsprobe bekannt. Proteine und/oder Peptide einer Flüssigkeitsprobe werden mittels Kapillarelektrophorese getrennt, anschließend direkt ionisiert und online über ein Interface in ein daran gekoppeltes Massenspektrometer zur Detektion überführt.

Zur Kontrolle des Zustandes eines menschlichen oder tierischen Körpers über einen längeren Zeitraum werden Zustände beschreibende Referenz- und Probenwerte sowie hieraus abgeleitete Abweichungen und Übereinstimmungen in einer Datenbank automatisch gespeichert und bei einer neuen Protein und/oder Peptidmusterbestimmung automatisch nach bestmöglichen Übereinstimmungen gesucht.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, bei einem Verfahren und einer Vorrichtung zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung eines Protein- und/oder Peptidmusters einer Flüssigkeitsprobe die darin enthaltenen Proteine und Peptide in einem gemeinsamen Erfassungs- und Auswertevorgang schnell und reproduzierbar zu ermitteln.

Diese Aufgabe wird bei einem Verfahren nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1 und bei einer Vorrichtung nach dem Oberbegriff des Anspruchs 6 durch die im jeweiligen Anspruch angegebene Merkmale gelöst.

Weiterbildungen und vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Durch kontinuierliches Zwischenspeichern der Massenbestandteile oder Strukturbestandteile der Proteine und/oder Peptide wird ein mehrdimensionales Datenfeld aus Rohdaten erhalten, aus sich dann unabhängig mittels Rechenalgorithmen echte Massen oder echte Strukturen berechnen lassen.

Gemäß einer Ausführungsform mit massenspektrometrischen Bestimmung wird durch kontinuierliches Zwischenspeichern der Einzelspektren des Massenspektrometers ein dreidimensionales Datenfeld des Gesamtspektrums erhalten, wobei die erste Dimension die Amplitude der Spektrallinien, die zweite Dimension die Zeit und die Dritte Dimension die Masse darstellt. Durch Auswertung mittels Rechenalgorithmen kann so eine präzise Angabe der echten Massen und jeweiligen Gesamtamplituden erfolgen. Dabei werden alle Massen und Gesamtamplituden in

einem gemeinsamen Auswertevorgang ermittelt und stehen eine Zuordnung zu den in der Flüssigkeitsprobe enthaltenen Proteinen und/oder Peptiden für einen Vergleich mit gespeicherten Werten zeitgleich zur Verfügung.

Gemäß einer Weiterbildung wird nach Zwischenspeicherung der Einzelspektren und vor Berechnung der echten Massen und der jeweiligen Gesamtamplituden eine Elimination der in den Spektren enthaltenen Störungen, insbesondere Rauschen, vorgenommen.

Da Störungen, insbesondere Rauschen, im Gegensatz zu Nutzsignalen keine systematisch wiederkehrenden Linien, im Spektrogramm erzeugen, können Störungen von Nutzsignalen unterschieden werden. Dadurch ist eine Elimination möglich. Die Erfassung und Auflösung von Nutzsignalen wird so gesteigert, wodurch eine höhere Zahl unterschiedlicher Proteine und/oder Peptide mit geringer Amplitude ihrer Spektrallinien ermittelbar sind.

Vorzugsweise werden nur Massen und Gesamtamplituden oberhalb vorgegebener Schwellwerte ausgewertet. Dadurch wird das Volumen der Daten der auswertenden Einzelspektren verringert und die Rechenzeit verkürzt.

Weiterhin kann anhand von Massen und Gesamtamplituden einzelner Proteine und/oder Peptide, die wegen ihres Vorhandenseins in allen Flüssigkeitsproben als Referenzwerte in der Datenbank gespeichert sind, eine Kalibrierung der Massen und Ge-

samtamplituden bei einer neuen Protein- und/oder Peptidmusterbestimmung vorgenommen.

Bei dieser Maßnahme wird die aus Voruntersuchungen gewonnene Erkenntnis genutzt, dass einige der bestimmbar Proteine und/oder Peptide grundsätzlich in allen untersuchten Flüssigkeitsproben und dort auch mit annähernd jeweils gleicher Konzentration vorhanden sind. Dies gilt für Proben von Spendern mit normalem und mit abweichendem Befund gleichermaßen. Durch Nutzung dieser Proteine und/oder Peptide als Referenzwerte können die Rohwerte der Spektren bei einer neuen Protein- und/oder Peptidmusterbestimmung und damit auch die Massen und Gesamtamplituden kalibriert und Vergleiche mit gespeicherten Mustern erleichtert werden.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand eines Ausführungsbeispiels und durchgeführter Versuchsreihen ermittelt.

Hierzu zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung,

Fig. 2 eine schematische Darstellung des Verarbeitungsablaufs der Messwerte bis zum Ergebnis,

Fig. 3a-d eine Darstellung dreidimensionaler Massenspektren von Flüssigkeitsproben mit normalem Befund und abweichenden Befunden sowie zugehöriger Tabellen

Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung. Aus einer Flüssigkeitsprobe 10, vorzugsweise Serum oder Urin, werden nach Ultrazentrifugation und Ultrafiltration erhaltene Fraktionen einem Kapillarelektrophoresegerät 14 zugeführt. Die Moleküle der Fraktionen gelangen über eine daran direkt angeschlossene Ionisierungseinheit 16 und über ein Interface 18 an ein online gekoppeltes Massenspektrometer 20. Die Spektrogramme des Massenspektrometer 20 gelangen zu einer Rechneinheit 22 die einen Speicher und Datenbank umfasst. Die programmgesteuerte Rechneinheit 22 dient einmal zur Steuerung der Vorrichtung. Außerdem werden die durch Detektion erhaltenen Meßwerte automatisch ausgewertet und in Datenbanken abgespeichert. Weiterhin gleicht das Programm neue Meßwerte automatisch mit den bereits gespeicherten Meßwerten ab.

Durch den Abgleich werden übereinstimmende und abweichende Parameter ermittelt, die zur Beschreibung des Zustandes eines menschlichen oder tierischen Körpers herangezogen werden können.

Mittels der Datenbanken ist es möglich, gleiche, ähnliche oder unterschiedliche Zustände des menschlichen oder tierischen Körpers zu identifizieren.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung eines Protein- und/oder Peptidmusters einer Flüssigkeitsprobe, die dem menschlichen oder tierischen Körper entnommen wird, kann von technisch ausgebildeten Personen durchgeführt werden. Die Anwendung bedarf keines

Arztes und kann auch außerhalb medizinischer Laboratorien angewendet werden.

Fig. 2 zeigt eine schematische Darstellung des Verarbeitungsablaufs der Messwerte bis zum Ergebnis. Oben ist der grobe Intensitätsverlauf über der gesamten Messzeit dargestellt. Für ein Zeitfenster von ca. 3 sec. Aus dem Intensitätsverlauf ist ein zugehöriges Spektrogramm dargestellt. Das Bild links unten zeigt eine dreidimensionale Darstellung aller Spektrogramme während einer Messzeit. Die Zeitachse als erste Dimension verläuft von rechts nach links. Die Intensitätsachse ist durch die Helligkeit dargestellt. Die Massenachse verläuft von oben nach unten nach oben. Nach Elimination von Störungen und unter Anwendung von Rechenalgorithmen ermittelt die Rechneinheit aus allen Einzelspektren die echte Masse und die Gesamtamplituden. Dabei werden in einer ersten Datenanalyse werden sämtliche Peaks identifiziert. Im nächsten Schritt ist die Ladung jedes Peaks bestimmt, wobei sowohl Isotopenverteilung als auch konjugierte Massen verwendet werden. Eine Tabelle der echten Massen, die mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 90% in allen untersuchten Flüssigkeitsproben vorkommen, ist schließlich in der Tabelle rechts unten dargestellt.

Fig. 3a-d zeigt eine Darstellung typischer Beispiele dreidimensionaler Massenspektren von Flüssigkeitsproben mit normalem Befund und abweichenden Befunden, nämlich MNGN, MCG und FSGS, sowie zugehöriger Tabellen. Jeder krankhafte Befund zeigt ein typisches Proteilmuster. Die Daten der Untersuchungen wurden, unterteilt in die verschiedenen Erkrankungen,

statistisch ausgewertet und mit den Daten der gesunden Probanden verglichen. Eine Reihe von Polypeptiden, die in den gesunden Probanden vorhanden ist, konnte bei Probanden mit krankhafte Befund nicht nachgewiesen werden, während zusätzliche Polypeptide nur bei Probanden mit krankhafte Befund, nicht aber bei den gesunden Probanden, gefunden werden konnten. Damit können krankheitstypische Proteinmuster aufgestellt werden.

Um die Ergebnisse zu erzielen wurde wie folgt vorgegangen. Alle Probanden wurden vorab mittels Nieren-Biopsien untersucht. Eine Gruppe von 18 normalen Probanden vergleichbaren Geschlechts und Alters mit normaler Nierenfunktion wurde untersucht, um ein normales Polypeptidmuster im Urin zu etablieren. Urinproben wurden von allen Probanden am morgen gesammelt. Die Proben wurden bei -70 C gelagert. Zur Probenaufarbeitung wurden die Proben getaut und 2 ml wurden über eine Pharmacia C2-Säule fraktioniert, um Polypeptide anzureichern und Salz, Harnstoff, und andere störende Komponenten zu entfernen. Polypeptide wurden mit 50% Acetonitril in Wasser mit 0,5% Ameisensäure eluiert. Das Eluat wurde lyophilisiert und in 20 µl H₂O aufgenommen.

Die mobile Phase enthielt 30% Methanol und 0,5% Ameisensäure in H₂O. Dieselbe Flüssigkeit wurde als Trägerflüssigkeit eingesetzt, mit 300 nl/min. Proben wurden mit Druck (1 psi für 10 sec) injiziert, dies entspricht etwa 100 nl Probe. Der Meßdurchlauf wurde bei 30 kV und 0,2 psi durchgeführt, für 45 min.

Wie in Tabelle 1 gezeigt, konnten 51 Polypeptide in mehr als 90% der normalen Urinproben gefunden werden. Zusätzlich konnten 70 Polypeptide in >70% der Proben gefunden werden, weitere 183 Polypeptide in >50% aller Proben. Der Einsatz dieses Verfahrens erlaubte die Detektion von ca. 1000 Polypeptiden in einer Probe. Ca 300 dieser Polypeptide konnten in mehr als 50% der gesunden Probanden gefunden werden und wurden. Die Daten erlauben das Aufstellen eines normalen Musters. 13 Urinproben von Probanden mit minimal change glomerulonephritis (MCGN), 13 mit membranöser GN (MGN) und 7 mit focal segmentaler Glomerulosclerose (FSGS) wurden mit den Normalmustern verglichen.

Drei Polypeptide die in mehr als 90% aller Proben gefunden wurden, wurden als interner Standard verwendet. 17 Polypeptide wurden ausschließlich in mehr als 90% der MCGN Probanden gefunden, Weitere 17 Polypeptide wurden ausschließlich in MNGN Probanden gefunden. Drei Polypeptide, 1312, 1679 und 1737 Da, waren in allen Proben vorhanden. Diese wurden als interne Standards eingesetzt, um Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Reproduzierbarkeit dieser Daten erlauben die differentielle Diagnose der Glomerulonephritiden auf Grund der Polypeptid Spektren. Somit ermöglicht der Vergleich der Polypeptidspektren aus Urinproben die Unterscheidung der drei verschiedenen Formen der Glomerulonephritis.

Im nächsten Schritt wurden 33 Probanden mit Nephritis untersucht. Die Daten sind in Tabelle 2 summiert. Alle Probanden erhielten früher verschiedene Schemata von Immunsuppressiva zur Therapie, 19 erhielten niedrig dosiertes Corticosteriod

und/oder Cyclosporin A zum Zeitpunkt der Untersuchung. Nephrotische Proteinurie konnte in 2 Probanden nachgewiesen werden, mit Protein Exkretion $> 3,5$ g/Tag. 12 Probanden zeigten zwischen $3,5$ und $0,5$ g/Tag Protein im Harn, 3 Probanden zwischen $0,5$ und $0,15$ g/Tag, und 16 Probanden waren in klinische Remission mit $< 0,15$ g/Tag Proteinurie und normalem Serum Kreatinin.

Die Daten der individuellen Untersuchungen wurden in Datenbanken gruppiert (je eine für eine der drei Krankheiten). Die Werte aus diesen Datenbanken, die die typischen Proteilmuster repräsentieren, wurden in Folge verglichen. Signifikante Homologien wurden in jeder Krankheitsgruppe gefunden. Ein Vergleich der Polypeptidmuster konnte für eine retrospektive Differentialdiagnose eingesetzt werden. Typische Beispiele für Spektren von Probanden mit MNGN, MCG und FSGS sind in Fig. 3 gezeigt. Jede Erkrankung zeigt ein typisches Proteilmuster. Die Daten der Untersuchungen wurden, unterteilt in die verschiedenen Erkrankungen, statistisch ausgewertet und mit den Daten der gesunden Probanden verglichen. Eine Reihe von Polypeptiden, die in den gesunden Probanden vorhanden ist, konnte in den kranken Probanden nicht nachgewiesen werden, während zusätzliche Polypeptide nur in den Probanden, nicht aber bei den gesunden Probanden, gefunden werden konnten. Damit können krankheitstypische Proteilmuster aufgestellt werden.

Tabelle 3 zeigt die Zusammenfassung von 122 Polypeptiden, die in mehr als 70% der Normalkontrollen gefunden wurden, im Vergleich zu den drei Krankheitsgruppen. Eine Reihe von Proteinen war Abwesend in den Probanden. Obwohl die Mehrheit der MCG Probanden in klinischer Remission war, konnten 56 Polypeptide, die in der Normalkontrolle vorhanden sind, nur in <25% der Probanden proben gefunden werden. 9 Polypeptide, die in >90% der Normalkontrollen gefunden wurden, waren abwesend in Probanden mit MNGN. Weiter 47 waren in <25% dieser Probanden gruppe detektierbar. Auch in dieser Gruppe konnte eine Reihe von Polypeptiden gefunden werden, die in der Normalkontrolle oder bei anderen Erkrankungen abwesend waren. 17 Polypeptide konnten identifiziert werden, die spezifisch in MNGN, aber in <25% der MCG oder FSGS Probanden vorhanden waren. Ein Polypeptid konnte nie in gesunden Probanden detektiert werden. Weitere 17 Polypeptide konnten nur im Urin von Probanden mit MCG detektiert werden. Dies ist um so bemerkenswerter, da die meisten von diesen Probanden in klinischer Remission waren.

Die verwendeten Abkürzungen habe folgende Bedeutung:

MNGN	Membranöse Glomerulonephritis
FSGS	Focal Segmentale Glomerulosclerose
MCGN bzw. MCG	Minimal Change Glomerulonephritis

Table 1

Sex	Age	Diagnosis	S-creatinine µMol/l	protein g/d	Therapy
m	18	FSGS	99	0.05	CSA
f	26	FSGS	150	11.0	CSA+CS
m	63	FSGS	< 93	0.05	CS
f	49	FSGS	80	0.05	CSA+CS
m	63	FSGS	95	0.02	CS
f	39	FSGS	75	2.0	CSA+CS
f	41	FSGS	16	0.7	CSA
m	38	MNGN	100	0.4	CSA+CS
m	43	MNGN	82	0.7	CS
f	32	MNGN	83	5.0	CSA+CS
m	36	MNGN	93	0.2	CS
m	48	MNGN	100	1.0	CSA+CS
f	68	MNGN	150	1.0	-
m	47	MNGN	93	3.0	CS
m	69	MNGN	128	0.02	CSA
f	34	MNGN	<80	3.0	CSA+CS
f	21	MNGN	80	1.0	CSA+CS
m	23	MNGN	150	0.3	-
m	44	MNGN	118	1.0	CSA
m	40	MNGN	119	1.0	CSA
m	21	MCGN	57	0.12	-
f	43	MCGN	114	0.01	CSA
m	45	MCGN +	< 93	0.01	-
m	61	MCGN +	<93	0.1	-
f	52	MCGN +	118	0.01	-
f	44	MCGN +	<80	0.02	CSA
m	39	MCGN *	< 93	0.02	-
f	70	MCGN *	95	0.08	-
m	68	MCGN	< 93	0.08	-
m	50	MCGN	< 93	0.05	-
m	18	MCGN	77	0.05	CSA+CS
f	28	MCGN	160	0.1	-
m	52	MCGN	93	0.4	CS

+ frequent relapse; Therapy: immunosuppression; CSA Cidlosporin A,

* DD FSGS CS: corticosteroids; -: currently no immunosuppression

Table 2

Mass	frequency normal [%]	normal vs MCC/FSCS [%]	normal vs MNGN [%]
1134,17	> 90	< 25	< 25
1157,30	> 90	> 50	> 50
1178,90	> 90	< 25	< 25
1194,19	> 90	> 50	< 25
1217,71	> 90	25 - 50	25 - 50
1223,91	> 90	> 50	25 - 50
1238,78	> 90	> 70	
1249,62	> 90	< 25	< 25
1255,23	> 90	< 25	< 25
1311,55	> 90	> 90	> 90
1313,43	> 90	< 25	> 50
1313,60	> 90	< 25	< 25
1315,54	> 90	25 - 50	25 - 50
1321,13	> 90	25 - 50	25 - 50
1377,71	> 90	> 70	> 50
1421,98	> 90	25 - 50	25 - 50
1424,18	> 90	> 70	> 70
1434,78	> 90	25 - 50	25 - 50
1451,12	> 90	< 25	< 25
1467,22	> 90	25 - 50	25 - 50
1508,02	> 90	25 - 50	25 - 50
1522,45	> 90	< 25	< 25
1538,86	> 90	< 25	< 25
1539,09	> 90	< 25	< 25
1579,93	> 90	< 25	< 25
1607,51	> 90	< 25	< 25
1635,13	> 90	< 25	< 25
1655,17	> 90	> 70	> 70
1679,21	> 90	> 90	> 90
1679,67	> 90	25 - 50	25 - 50
1697,51	> 90	< 25	< 25
1715,38	> 90	< 25	< 25
1737,32	> 90	> 90	> 90
1893,06	> 90	< 25	< 25
1894,62	> 90	< 25	< 25
1910,42	> 90	< 25	< 25
1933,10	> 90	25 - 50	25 - 50
1948,51	> 90	25 - 50	25 - 50
2047,25	> 90	< 25	> 50
2063,36	> 90	< 25	< 25
2116,68	> 90	< 25	< 25
2256,34	> 90	< 25	< 25
2393,32	> 90	< 25	< 25

Mass	frequency normal [%]	normal vs MCG/SCS [%]	normal vs MNGN [%]
2408,39	> 90	< 25	< 25
2562,42	> 90	> 50	< 25
2999,84	> 90	25 - 50	< 25
3279,82	> 90	> 50	
3400,96	> 90	< 25	
4351,15	> 90	< 25	> 90
4679,60	> 90	< 25	> 50
1027,85	> 70	< 25	
1071,62	> 70	25 - 50	25 - 50
1081,30	> 70	< 25	< 25
1141,29	> 70	25 - 50	25 - 50
1160,14	> 70	< 25	< 25
1191,11	> 70	25 - 50	25 - 50
1195,07	> 70	> 50	< 25
1199,44	> 70	> 90	> 90
1200,07	> 70	< 25	< 25
1235,05	> 70	25 - 50	25 - 50
1261,15	> 70	25 - 50	25 - 50
1265,14	> 70	< 25	< 25
1275,68	> 70	< 25	< 25
1282,87	> 70	25 - 50	25 - 50
1297,21	> 70	25 - 50	> 50
1307,92	> 70	25 - 50	25 - 50
1311,78	> 70	> 90	> 90
1367,23	> 70	< 25	< 25
1368,21	> 70	< 25	< 25
1389,44	> 70	25 - 50	25 - 50
1421,44	> 70	25 - 50	25 - 50
1424,54	> 70	> 70	> 70
1438,12	> 70	> 50	25 - 50
1445,96	> 70	< 25	< 25
1461,66	> 70	25 - 50	25 - 50
1472,92	> 70	25 - 50	25 - 50
1545,48	> 70	< 25	< 25
1561,03	> 70	25 - 50	25 - 50
1578,80	> 70	25 - 50	25 - 50
1589,00	> 70	> 50	< 25
1635,96	> 70	< 25	< 25
1651,06	> 70	25 - 50	25 - 50
1753,81	> 70	25 - 50	25 - 50
1761,26	> 70	> 50	> 50
1765,48	> 70	25 - 50	25 - 50
1766,87	> 70	25 - 50	25 - 50
1875,54	> 70	25 - 50	25 - 50
1877,49	> 70	25 - 50	25 - 50
1888,58	> 70	25 - 50	25 - 50
1913,25	> 70	> 50	25 - 50

Mass	frequency normal	normal against MCC/PSGS	normal a- gainst MINGN
1931,91	> 70	25 - 50	25 - 50
1947,41	> 70	> 90	> 90
2007,20	> 70	25 - 50	25 - 50
2045,33	> 70	> 50	> 50
2068,65	> 70	< 25	< 25
2174,04	> 70	< 25	> 70
2248,28	> 70	25 - 50	25 - 50
2312,87	> 70	< 25	< 25
2546,77	> 70	< 25	< 25
2568,70	> 70	< 25	< 25
2662,29	> 70	25 - 50	25 - 50
2678,14	> 70	< 25	< 25
2694,10	> 70	25 - 50	25 - 50
2735,76	> 70	< 25	< 25
2741,39	> 70	< 25	< 25
2824,26	> 70	< 25	25 - 50
2888,20	> 70		
3010,32	> 70	> 50	25 - 50
3264,36	> 70	< 25	< 25
3384,47	> 70	< 25	
3439,94	> 70	25 - 50	< 25
3456,69	> 70	< 25	< 25
3478,40	> 70	> 50	< 25
3721,63	> 70	25 - 50	25 - 50
3968,61	> 70	< 25	25 - 50
4041,83	> 70	25 - 50	
4096,96	> 70	< 25	< 25
4746,25	> 70	25 - 50	25 - 50
5799,20	> 70	< 25	< 25
6169,19	> 70	< 25	< 25
6183,91	> 70	< 25	< 25

Table 3: Markers for MNGN and MCG

mass	MCGN [%]	Normal [%]	MNGN [%]	mass	MNGN [%]	Normal [%]	MCGN [%]
1193.95	> 90	25 - 50	25 - 50	1108.21	> 90	25 - 50	25 - 50
1259.13	> 90	< 25	< 25	1386.38	> 90	0	25 - 50
1265	> 90	< 25	25 - 50	1737.36	> 90	0	25 - 50
1435.07	> 90	< 25	< 25	1781.24	> 90	< 25	< 25
1523.16	> 90	25 - 50	25 - 50	1797.24	> 90	< 25	< 25
1538.77	> 90	< 25	< 25	1850.6	> 90	0	< 25
1561.05	> 90	< 25	< 25	2227.55	> 90	< 25	< 25
1635.99	> 90	< 25	< 25	2405.97	> 90	0	0
1651.03	> 90	25 - 50	25 - 50	2751.55	> 90	0	< 25
1679.08	> 90	< 25	< 25	3841.38	> 90	< 25	< 25
1680.33	> 90	< 25	< 25	4152.6	> 90	< 25	< 25
1910.6	> 90	< 25	< 25	4239.56	> 90	0	< 25
2409.04	> 90	< 25	< 25	4624.34	> 90	< 25	< 25
2824.47	> 90	< 25	< 25	4711.49	> 90	< 25	< 25
3208.58	> 90	25	25	4891.54	> 90	< 25	< 25
3441.19	> 90	< 25	< 25	5755.82	> 90	0	< 25
3456.4	> 90	25 - 50	25 - 50	5869.67	> 90	0	< 25

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung eines Protein- und/oder Peptidmusters einer Flüssigkeitsprobe (10), die dem menschlichen oder tierischen Körper zur Kontrolle seines Zustandes entnommen wird, wobei die Peptide und Proteine der Flüssigkeitsprobe (10) nach Aufbereitung einer Analyse unterzogen werden, wobei Zustände eines menschlichen oder tierischen Körpers beschreibende Referenz- und Probenwerte sowie hieraus abgeleitete Abweichungen und Übereinstimmungen ermittelt werden, in einer Datenbank automatisch gespeichert werden und bei einer neuen Protein- und/oder Peptidmusterbestimmung automatisch nach bestmöglichen Übereinstimmungen gesucht wird, dadurch gekennzeichnet, dass Massenbestandteile oder Strukturbestandteile der Proteine und/oder Peptide ermittelt und zwischengespeichert werden, anschließend durch gemeinsame Auswertung der zwischengespeicherten Massenbestandteile oder Strukturbestandteile echte Massen oder echte Strukturen berechnet werden und aus der Kombination der berechneten echten Massen oder echten Strukturen eine Zuordnung zu den in der Flüssigkeitsprobe (10) enthaltenen Proteinen und/oder Peptiden vorgenommen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Peptide und Proteine der Flüssigkeitsprobe (10) mittels Kapillarelektrophorese getrennt, anschließend direkt ionisiert und online über ein Interface (18) in ein daran gekoppeltes Mas-

senspektrometer (20) zur Detektion überführt werden, , dadurch gekennzeichnet, dass Einzelspektren des Massenspektrometers (20) kontinuierlich zwischengespeichert werden, anschließend durch gemeinsame Auswertung der zwischengespeicherten Einzelspektren echte Massen und die jeweiligen Gesamtamplituden berechnet werden und aus der Kombination der berechneten echten Massen und der jeweiligen Gesamtamplituden eine Zuordnung zu den in der Flüssigkeitsprobe (10) enthaltenen Proteinen und/oder Peptiden vorgenommen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass nach Zwischenspeicherung der Einzelspektren und vor Berechnung der echten Massen und der jeweiligen Gesamtamplituden eine Elimination der in den Spektren enthaltenen Störungen, insbesondere Rauschen, vorgenommen wird.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass nur Massen und Gesamtamplituden oberhalb vorgegebener Schwellwerte ausgewertet werden.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass anhand von Massen und Gesamtamplituden einzelner Proteine und/oder Peptide, die wegen ihres Vorhandenseins in allen Flüssigkeitsproben als Referenzwerte in der Datenbank gespeichert sind, eine Kalibrierung der Massen und Gesamtamplituden bei einer neuen Protein- und/oder Peptidmusterbestimmung vorgenommen wird.

6. Vorrichtung zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung eines Protein- oder Peptidmusters einer Flüssig-

keitsprobe (10), die dem menschlichen oder tierischen Körper zur Kontrolle seines Zustandes entnommen worden ist, wobei die Vorrichtung eine Aufbereitungsvorrichtung, eine Analyse und eine Rechneinheit (22) mit einem Programm zur Steuerung der Vorrichtung sowie zur automatischen Auswertung und Speicherung der Meßwerte und zur Abgleichung neuer Meßwerte mit den bereits gespeicherten Meßwerten enthält, wobei Zustände eines menschlichen oder tierischen Körpers beschreibende Referenz- und Probenwerte sowie hieraus abgeleitete Abweichungen und Übereinstimmungen ermittelbar und in einer Datenbank speicherbar sind und bei einer neuen Protein- und/oder Peptidmusterbestimmung automatisch nach bestmöglichen Übereinstimmungen suchbar, dadurch gekennzeichnet, daß mittels der Analysevorrichtung Massenbestandteile oder Strukturbestandteile der Proteine und/oder Peptide ermittelbar sind und die Massenbestandteile oder Strukturbestandteile als Werte in einem Speicher zwischenspeicherbar und mittels der Rechneinheit (22) echte Massen oder echte Strukturen berechenbar sind, und aus der Kombination der berechneten echten Massen oder echten Strukturen sowie Vergleich mit in der Datenbank gespeicherten Werten eine Zuordnung zu den in der Flüssigkeitsprobe (10) enthaltenen Proteinen und/oder Peptiden vornehmbar ist.

7. Vorrichtung nach Anspruch 6, wobei die Vorrichtung ein Kapillarelektrophoresegerät (14), eine Ionisierungseinheit (16), ein über ein Interface (18) online gekoppeltes Massenspektrometer (20) und eine Rechneinheit (22) mit einem Programm zur Steuerung der Vorrichtung sowie zur automatischen Auswertung und Speicherung der Meßwerte und zur Abglei-

chung neuer Meßwerte mit den bereits gespeicherten Meßwerten enthält, dadurch gekennzeichnet, daß Einzelspektren des Massenspektrometers (20) kontinuierlich in einem Speicher zwischenspeicherbar und mittels der Rechneinheit (22) echte Massen und die jeweiligen Gesamtamplituden berechenbar sind, und aus der Kombination der berechneten echten Massen und der jeweiligen Gesamtamplituden sowie Vergleich mit in der Datenbank gespeicherten Werten eine Zuordnung zu den in der Flüssigkeitsprobe (10) enthaltenen Proteinen und/oder Peptiden vornehmbar ist.

8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß mittels der Rechneinheit (22) nach Zwischenspeicherung der Einzelspektren und vor Berechnung der echten Massen und der jeweiligen Gesamtamplituden eine Elimination der in den Spektren enthaltenen Störungen, insbesondere Rauschen, vornehmbar ist.

9. Vorrichtung nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass mittels der Rechneinheit (22) ein Schwellwert vorgebar ist oberhalb dessen Massen und Gesamtamplituden auswertbar sind.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass mittels der Rechneinheit (22) anhand von Massen und Gesamtamplituden einzelner Proteine und/oder Peptide, die wegen ihres Vorhandenseins in allen Flüssigkeitsproben als Referenzwerte in der Datenbank gespeichert sind, eine Kalibrierung der Massen und Gesamtamplituden bei

einer neuen Protein- und/oder Peptidmusterbestimmung vornehmbar ist.

1/4

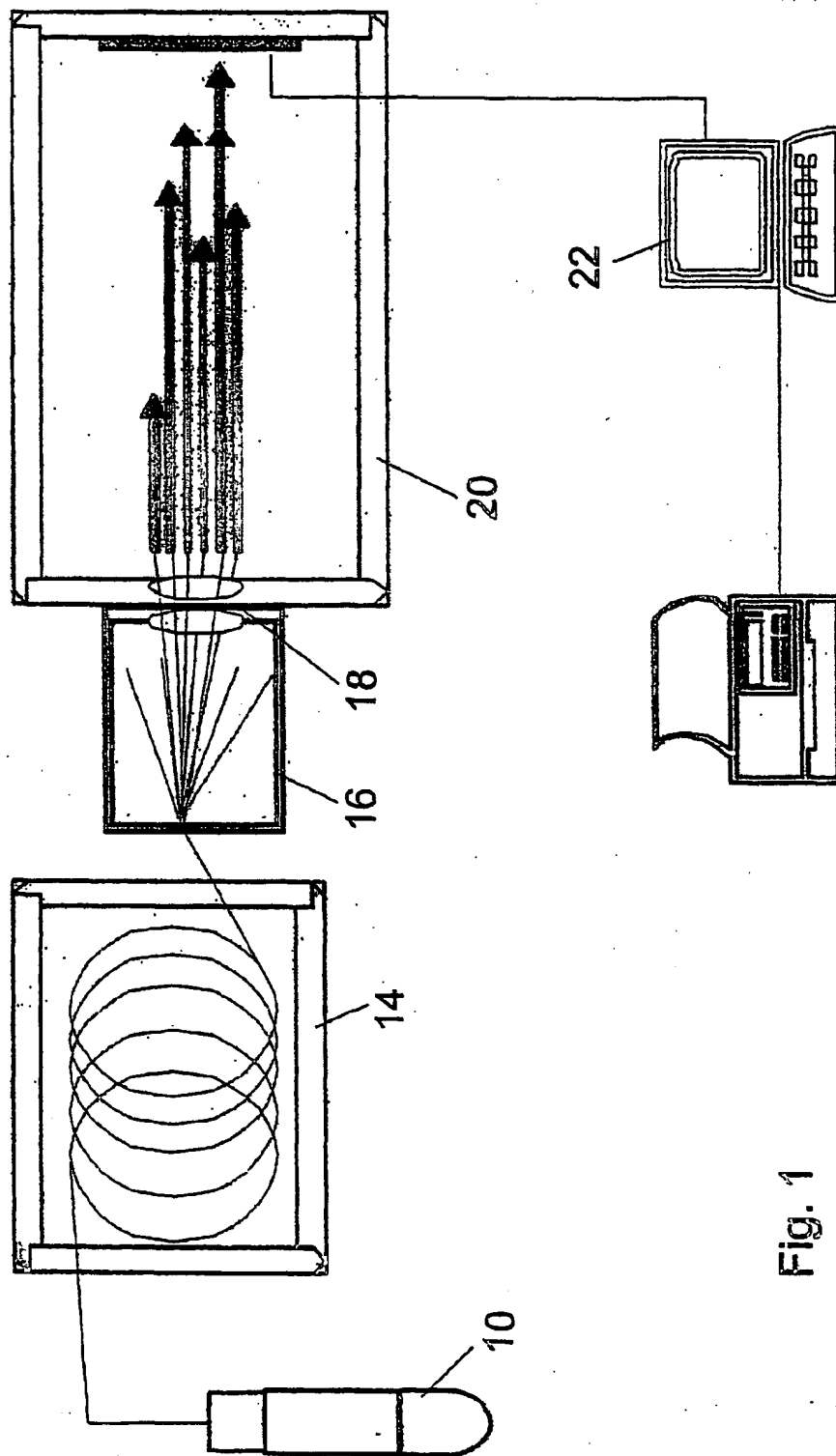


Fig. 1

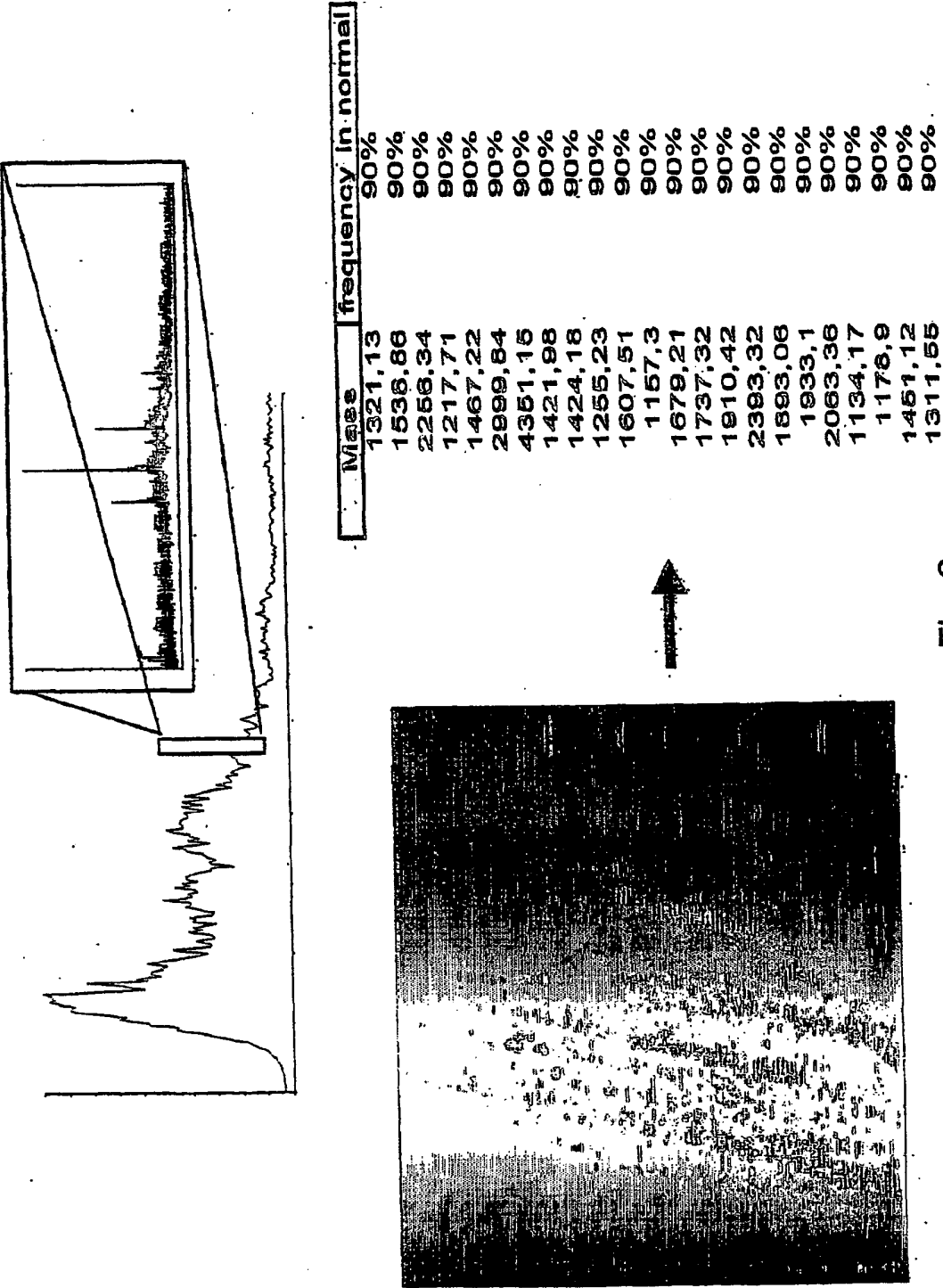


Fig. 2

3/4

Mass	frequency in normal	normal against MNGN
1321,13	90%	25%
1538,88	90%	<24%
2256,34	90%	<24%
1217,71	90%	25%
1467,22	90%	25%
2889,84	90%	<24%
4351,15	90%	90%
1421,98	90%	25%
1424,18	90%	70%
1255,23	90%	<24%
1607,61	90%	<24%
1157,3	90%	50%
1679,21	90%	90%
1737,32	90%	90%
1910,42	90%	<24%
2393,32	90%	<24%
1893,06	90%	<24%
1933,1	90%	25%
2063,36	90%	<24%
1134,17	90%	<24%
1178,8	90%	<24%
1451,12	90%	<24%
1311,55	90%	90%
1194,19	90%	<24%
2116,68	90%	<24%
1697,51	90%	<24%
2408,39	90%	<24%
3400,98	90%	
1249,62	90%	<24%
1948,51	90%	25%
1522,45	90%	<24%
1579,93	90%	<24%
1434,78	90%	25%
1313,6	90%	<24%
2582,42	90%	
1238,78	90%	
1377,71	90%	
1655,17	90%	50%
1679,67	90%	70%
1223,91	90%	25%
1508,02	90%	25%

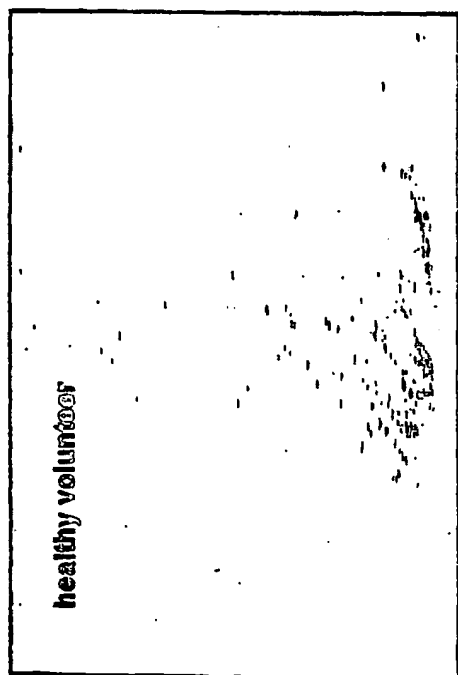


Fig. 3a

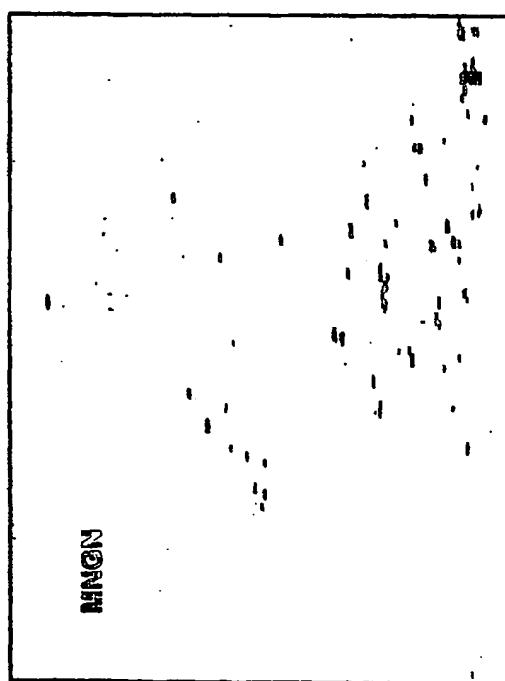


Fig. 3b

Mass	frequency	normal	normal against MCG/FSGS
1321,13	90%	90%	<24%
1638,86	90%	90%	<24%
2256,34	90%	90%	25%
1217,71	90%	90%	25%
1467,22	90%	90%	25%
2989,84	90%	90%	<24%
4351,15	90%	90%	25%
1421,98	90%	90%	70%
1424,18	90%	90%	<24%
1255,23	90%	90%	<24%
1607,51	90%	90%	50%
1167,3	90%	90%	90%
1679,21	90%	90%	90%
1737,32	90%	90%	<24%
1810,42	90%	90%	<24%
2393,32	90%	90%	<24%
1893,08	90%	90%	25%
1933,1	90%	90%	<24%
2063,36	90%	90%	<24%
1134,17	90%	90%	<24%
1178,9	90%	90%	<24%
1451,12	90%	90%	90%
1311,55	90%	90%	50%
1194,19	90%	90%	<24%
2116,68	90%	90%	<24%
1697,51	90%	90%	<24%
2408,39	90%	90%	<24%
3400,95	90%	90%	<24%
1249,62	90%	90%	25%
1948,51	90%	90%	<24%
1522,45	90%	90%	<24%
1679,93	90%	90%	25%
1434,78	90%	90%	<24%
1313,6	90%	90%	50%
2582,42	90%	90%	70%
1238,78	90%	90%	70%
1377,71	90%	90%	70%
1655,17	90%	90%	25%
1679,67	90%	90%	50%
1223,91	90%	90%	

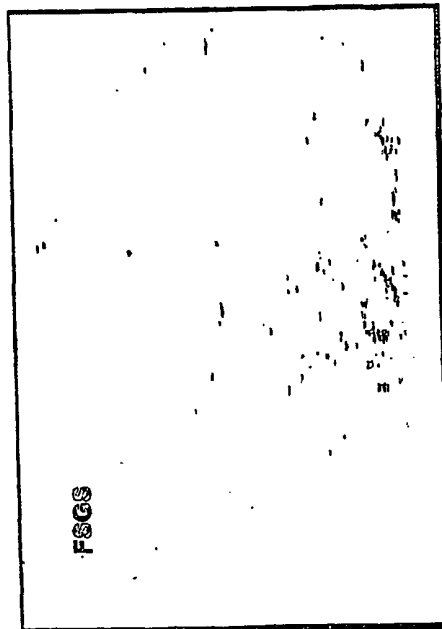


Fig. 3c

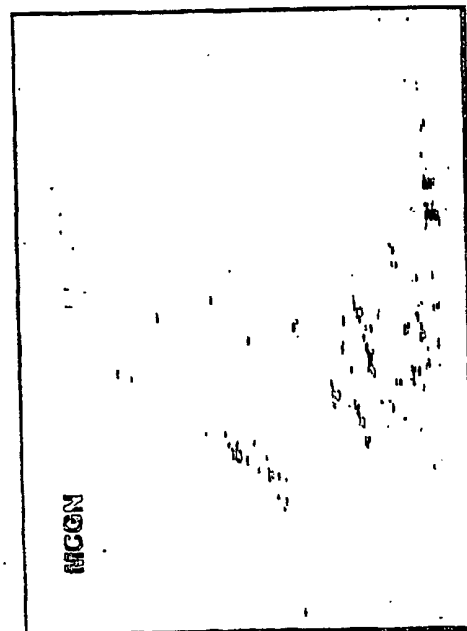


Fig. 3d

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)